

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS CONTAMINANTES DE CERVEZA *Lactobacillus*  
Y *Pediococcus* EN EL AMBIENTE DE ELABORACIÓN DE CERVEZA

POR

JORGE HUGO GARCÍA GARCÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

MARZO, 2017

“Distribución de bacterias contaminantes de cerveza *Lactobacillus* y *Pediococcus* en el ambiente de elaboración de cerveza.”

Comité de Tesis

---

Dr. Benito Pereyra Alferéz

Presidente

---

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera

Secretario

---

Dr. Luis J. Galán Wong

Vocal

---

Dr. José María Viader Salvadó

Vocal

---

Dra. Myriam Elías Santos

Vocal

“Distribución de bacterias contaminantes de cerveza *Lactobacillus* y *Pediococcus* en el ambiente de elaboración de cerveza.”

Dirección de Tesis

---

Dr. Benito Pereyra Alferéz

Director

---

Dr. Luis Cástulo Damas

Buenrostro

Director Externo

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue apoyado económicamente por el proyecto 212773 del programa de estímulos económicos a la investigación, desarrollo tecnológico e innovación 2014 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Conacyt), además del apoyo económico a mí como becario Conacyt (237706).

Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo de diversas personas a lo largo de mis estudios de doctorado. Quisiera agradecer a Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, especialmente a Luis Damas y Esmeralda Pérez por su apoyo para el diseño de la investigación y su continuo interés así como ayuda a lo largo del proyecto para la obtención de resultados. De igual manera a mis compañeros de laboratorio en el L4 del instituto de Biotecnología; Astrid, Claudia, Cesar, Fátima, Mickey, Saúl, Ramiro, Zanya y Alan por su apoyo en experimentos y discusión de resultados.

Por ultimo un gran agradecimiento a mi director de tesis Benito Pereyra por ser una constante guía a lo largo de mi preparación académica y quien siempre tuvo confianza en mi persona y en mi habilidad científica.

## DEDICATORIA

**A mi esposa** Erika por estar todos estos años de formación académica a mi lado siempre apoyándome y empujándome a querer mejorar cada día como persona, profesionista y científico.

**A mis papas** Juan Antonio y Ana María por darme la posibilidad de estudiar una carrera profesional así como dos posgrados. Sin el apoyo constante de ellos nunca habría podido llegar a ser la persona que soy hoy en día.

# ÍNDICE

Introducción	Pg. 1
Antecedentes	Pg. 3
Definición del problema y justificación	Pg. 16
Hipótesis y objetivos	Pg. 17
Material y métodos	Pg. 18
Resultados	Pg. 22
Discusión	Pg. 29
Conclusión	Pg. 34
Perspectivas	Pg. 35
Bibliografía	Pg. 36
Resumen Bibliográfico	Pg. 39

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Iniciadores para la amplificación por PCR de genes seleccionados	... Pg. 20
<b>Tabla II.</b> Cepas bacterianas aisladas del ambiente cervecero	..... Pg. 23

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Bacterias reportadas en las distintas etapas del proceso de elaboración de cerveza	..... Pg. 4
<b>Figura 2.</b> Etapas del proceso de elaboración de cerveza	..... Pg. 5
<b>Figura 3.</b> Representación del mecanismo de resistencia a lúpulo	..... Pg. 10
<b>Figura 4.</b> Crecimiento bacteriano de las cepas aisladas en cerveza	..... Pg. 22
<b>Figura 5.</b> Fotografías al microscopio óptico de las cepas aisladas del ambiente cervecero	..... Pg. 24
<b>Figura 6.</b> Imágenes de microscopio electrónico de barrido	..... Pg. 25
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en gel de agarosa con los fragmentos de PCR para <i>horA</i> y restricción de <i>horA</i> con <i>Bfal</i>	..... Pg. 26
<b>Figura 8.</b> Gel de agarosa con fragmentos amplificados del gen rRNA16S	..... Pg. 27
<b>Figura 9.</b> Patrón de restricción de la endonucleasa <i>Bfal</i> en los fragmentos amplificados del gen rRNA16S por PCR de las cepas aisladas en electroforesis en gel de agarosa al 1 %	..... Pg. 28
<b>Figura 10.</b> Gel de agarosa con fragmentos amplificados del gen <i>horA</i>	..... Pg. 28
<b>Figura 11.</b> Relación de identidades por el método de “Neighbor joining” de la secuencia del gen rRNA16S de cuatro cepas aisladas	..... Pg. 31
<b>Figura 12.</b> Visión general de las especies bacterianas y genes de resistencia de las cepas aisladas del proceso cervecero	..... Pg. 32

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BAL:** Bacterias ácido lácticas

**ORF:** Marco abierto de lectura

**FPM:** Fuerza protón motriz

**MRS:** Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe

**UBA:** Agar universal de cerveza

**NBB:** Medio de detección para bacterias contaminantes de cerveza

**OD<sub>600</sub>:** Densidad óptica a 600nm de longitud de onda



## RESUMEN

La cerveza es una bebida fermentada en la cual la actividad microbiana define las características del producto y se encuentra involucrada en todas las etapas del proceso de su producción. La diversidad de microorganismos en el proceso de elaboración de cerveza es limitada debido al ambiente restrictivo de esta, dado especialmente por los iso- $\alpha$ -ácidos del lúpulo y el etanol, los cuales poseen actividad antimicrobiana. Aun así, algunas bacterias pueden crecer en cerveza. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son reportadas como las responsables de más del 70 % de las contaminaciones a cerveza. Estas bacterias contaminantes de cerveza tienen la característica en común de la resistencia a los iso- $\alpha$ -ácidos del lúpulo, la cual está dada por elementos genéticos como los transportadores multidrogas *horA* y ORF5; sin embargo, la tolerancia a los compuestos del lúpulo puede ser una característica multifactorial que incluye la especie bacteriana y los genes de resistencia a lúpulo. Por lo que es importante rastrear las especies bacterianas contaminantes y sus genes de resistencia a lúpulo en el ambiente cervecero. En este trabajo aislamos 10 cepas de BAL y una de *Bacillus* sp. de un ambiente de elaboración de cerveza; además de los genes de resistencia *horA* y ORF en 10 de las cepas aisladas, incluyendo a *Bacillus* sp. el cual no pudo crecer en cerveza. Las cepas de BAL fueron identificadas con la secuencia y patrón de restricción con la endonucleasa *Bfal*, resultando en cuatro especies distintas; *L. rossiae*, *P. damnosus*, *L. brevis* y *L. casei*, La mayoría de las cepas y genes de resistencia a lúpulo fueron encontrados en el ambiente del área de fermentación.

## ABSTRACT

Beer is a fermented beverage where microbial activity is involved in every step of its production defining the characteristics of the final product. But the diversity of microorganisms present in this process is limited mainly by its restrictive environment given especially by the iso- $\alpha$ -acids from hop and ethanol which have antimicrobial activity. Despite these unfavorable conditions for bacterial growth, some beer spoilers are able to progress in beer. Lactic acid bacteria (LAB) are reported to be responsible for approximately 70 % of all beer spoilage incidents. These beer spoilers have the common characteristic of resistance to iso- $\alpha$ -acids found in hops given by genetic elements such as ORF5 and the multi-drug transporter *horA*. However, the tolerance to hop compounds could be a multi-factorial trait that includes the bacterial species and the hop-resistance genes. So it is important to track the bacterial beer spoiler species and hop-resistance genes in a brewery environment. In this work we isolated 10 beer spoiling LAB strains and one *Bacillus* sp. from a brewery environment and we found hop-resistance genes (*horA*, ORF5) in 10 of the isolated strains, including the non-beer spoiler *Bacillus*. The isolated LAB strains were identified by rRNA16S gene sequence and restriction with *Bfal*, resulting in four species, *L. rossiae*, *P. damnosus*, *L. brevis* and *L. casei*. Most of the strains and hop-resistance genes were found in the environment of the fermentation stage.

## INTRODUCCIÓN

La cerveza siendo una bebida fermentada, la actividad microbiana está involucrada en todas las etapas de su proceso de elaboración definiendo las características del producto final (Bokulich y Bamforth, 2013). El proceso microbiano más importante en la producción de cerveza es la fermentación por *Saccharomyces* en el extracto de un cereal; pero otros microorganismos, normalmente indeseados, pueden estar presentes en el proceso. Sin embargo, los microorganismos presentes en la cerveza y su proceso de elaboración están limitados por el ambiente restrictivo de la misma. Es por esto que la cerveza es clasificada como una bebida segura con alta estabilidad microbiológica donde microorganismos patógenos no pueden crecer. La estabilidad microbiológica está dada por el contenido de etanol, alta concentración de dióxido de carbono, pH ácido y poco oxígeno. La cerveza también contiene lúpulo, el cual da el sabor amargo característico. Los compuestos del lúpulo, principalmente los iso- $\alpha$ -ácidos, poseen actividad antimicrobiana el cual es una defensa adicional contra las bacterias (Bokulich y Bamforth, 2013; Richards y Macrae, 1964). Aun y con estas condiciones no favorables para el crecimiento microbiano, algunas bacterias si logran crecer en cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013; Fernandez y Simpson, 1993; Suzuki, 2011). Estas bacterias contaminantes de cerveza pueden causar un incremento en la turbidez y cambios sensoriales que afectan la calidad final del producto. La mayoría de las prácticas de fermentación modernas ocurren en condiciones relativamente asépticas y utilizando cultivos puros para evitar estos microorganismos indeseados en el proceso de elaboración de cerveza, pero las contaminaciones ambientales representan una amenaza prevalente para la calidad del producto (Bokulich *et al.*, 2015).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) como *Lactobacillus* y *Pediococcus* son reportadas como las responsables de más del 70 % de todos los incidentes de contaminación microbiológica en cerveza (Garofalo *et al.*, 2015; Suzuki, 2011). Aun y cuando el grupo de BAL contiene numerosas especies, solo pocas

pueden crecer en cerveza. Estas bacterias contaminantes de cerveza tienen la característica en común de resistencia a los iso- $\alpha$ -ácidos del lúpulo por medio de elementos genéticos como el transportador multidrogas *horA*, *horC* y el transportador de cationes *hitA*, así como *horB*, el regulador transcripcional de *horC*, y el ORF5, los cuales se encuentran comúnmente en plásmidos (Bergsveinson *et al.*, 2015; Bokulich *et al.*, 2015; Bokulich y Bamforth, 2013; Iijima *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2005). Estos marcadores genéticos se pueden utilizar para detectar bacterias potencialmente contaminantes (Bokulich *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2005; Suzuki, 2011; Ziola, 2007). Algunos de estos genes de resistencia también se han encontrado en bacterias no ácido lácticas como *Bacillus*, pero no de manera frecuente (Haakensen y Ziola, 2008). Aun así, la tolerancia a los compuestos del lúpulo podría ser una característica multifactorial que incluye a la especie bacteriana así como a los genes de resistencia a lúpulo (Behr *et al.*, 2015). Por lo que es importante rastrear a las bacterias contaminantes de cerveza y los genes de resistencia a lúpulo en el ambiente de una cervecería, donde pueden persistir en biofilms y otras reservas ambientales, manteniéndose como fuentes potenciales de contaminación (Bokulich *et al.*, 2015; Garofalo *et al.*, 2015), donde podrían transferir de manera horizontal los genes de resistencia a lúpulo a bacterias del ambiente cervecero que previamente eran inocuas para la cerveza. Por lo tanto el objetivo de este estudio fue aislar bacterias de diversas áreas del ambiente de una cervecería para rastrear la presencia de BAL específicas por restricción y secuenciación del gen rRNA16S, así como detectar los genes de resistencia a lúpulo *horA* y ORF5 por amplificación por PCR y secuenciación.

## ANTECEDENTES

### Cerveza

La cerveza es reconocida como una bebida segura ya que microorganismos patógenos no pueden crecer en ella, esto se debe a la presencia de etanol (0.5 a 10 % p/p), alto contenido de dióxido de carbono (0.5% p/v), pH ácido (3.8 a 4.7), concentración reducida de oxígeno (menos de 0.3 ppm) y ácidos de lúpulo (17 a 55 µg/ml) lo cuales poseen actividades antimicrobianas (Suzuki, 2011). La cerveza también es un medio inadecuado para el crecimiento de microorganismos ya que la mayoría de los nutrientes son utilizados en la fermentación por la levadura cervecera (Bokulich y Bamforth, 2013). Aun y con estas condiciones inadecuadas para el crecimiento de microorganismos, existen algunos que si pueden crecer en cerveza, siendo los más dañinos y frecuentes las bacterias ácido lácticas (Bokulich y Bamforth, 2013; Garofalo *et al.*, 2015; Suzuki, 2011).

### Proceso de elaboración de cerveza

De manera estricta, la fermentación de la cerveza es un proceso microbiológico monocultivo; pero el proceso completo implica la sucesión de microorganismos que afectan la calidad final del producto (Fig. 1) donde las bacterias contaminantes pueden entrar al proceso de elaboración en cualquier etapa del mismo (Bokulich y Bamforth, 2013; Storgårds, 2000; Vaughan *et al.*, 2005). El escenario ideal sería que no se presentara ningún microorganismo más que la levadura *Saccharomyces* para la fermentación del mosto, pero siempre existe riesgo de contaminación microbiológica debido a que la producción de cerveza es un proceso no estéril donde se combina agua, azúcares de un cereal y lúpulo para formar el mosto, el cual es un ambiente rico nutrientes que se encuentra vulnerable ante los microorganismos del ambiente

hasta que se agrega la levadura para comenzar la fermentación. (Bokulich y Bamforth, 2013; Vaughan *et al.*, 2005). Una vez que el mosto es transformado en cerveza por la levadura, es mucho más resistente a las contaminaciones microbianas, pero aun así se mantiene la amenaza constante de contaminación por BAL resistentes a los ácidos del lúpulo (Suzuki, 2011).

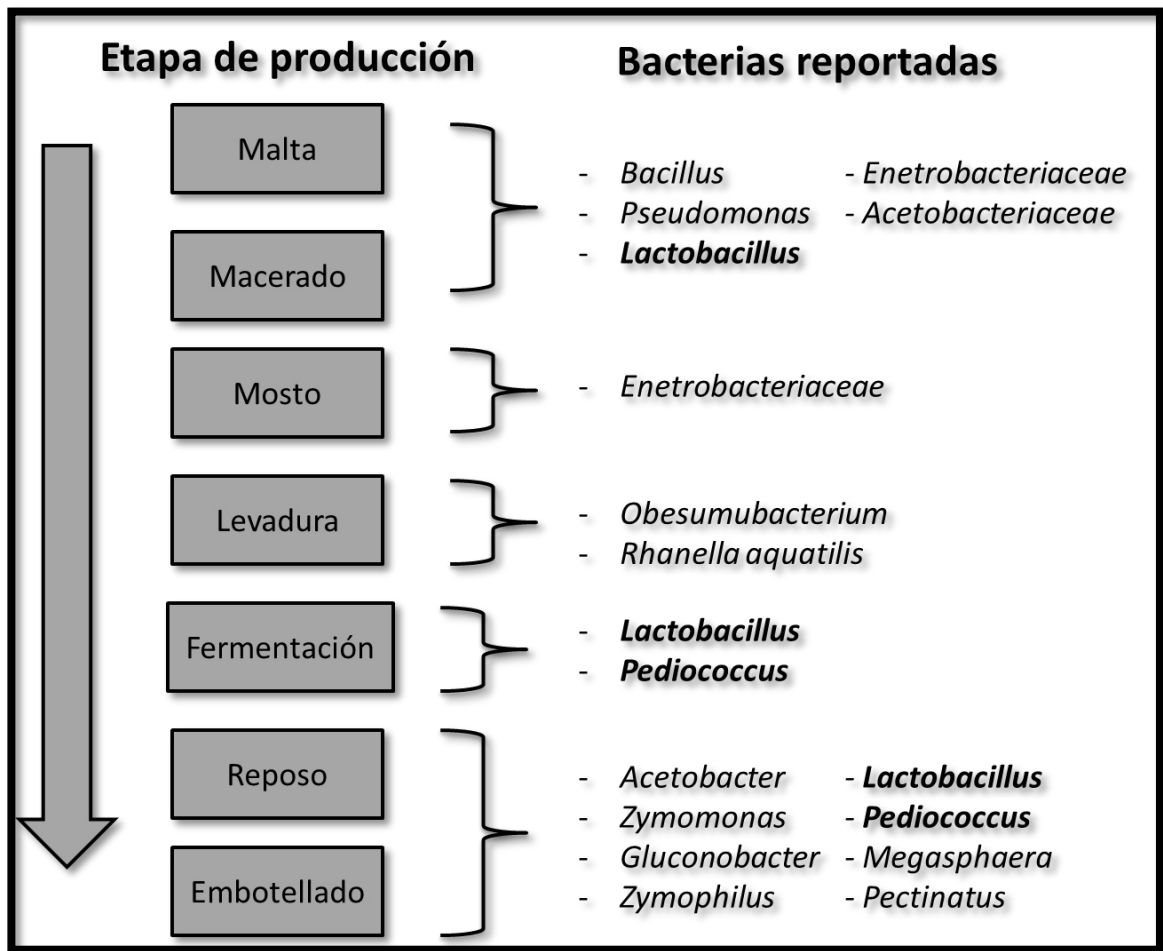


Figura 1. Bacterias reportadas en las distintas etapas del proceso de elaboración de cerveza.

El proceso de elaboración de cerveza es un proceso largo que implica cambios fisicoquímicos (Fig. 2) como el malteado de los granos de cebada, la molienda de los granos y la maceración de los granos molidos a una temperatura de 45 a 65°C para obtener los azúcares fermentables en solución

(mosto), posteriormente se filtra el mosto y se agrega el lúpulo elevando la temperatura a 100°C para isomerizar y volver solubles los ácidos del lúpulo, efectivamente esterilizando el mosto. Es por esto que en etapas anteriores a la adición del lúpulo e hirvición del mosto no es muy dañina la contaminación microbiológica, pero si existiera crecimiento de microorganismos en la cebada, este puede afectar la germinación de la malta por competencia de oxígeno (Bokulich y Bamforth, 2013). Una vez que el mosto se transfiere a los fermentadores, este es altamente vulnerable a microorganismos oportunistas si no se toman precauciones para asegurar una rápida fermentación, la cual estabiliza el mosto contra la contaminación microbiana.

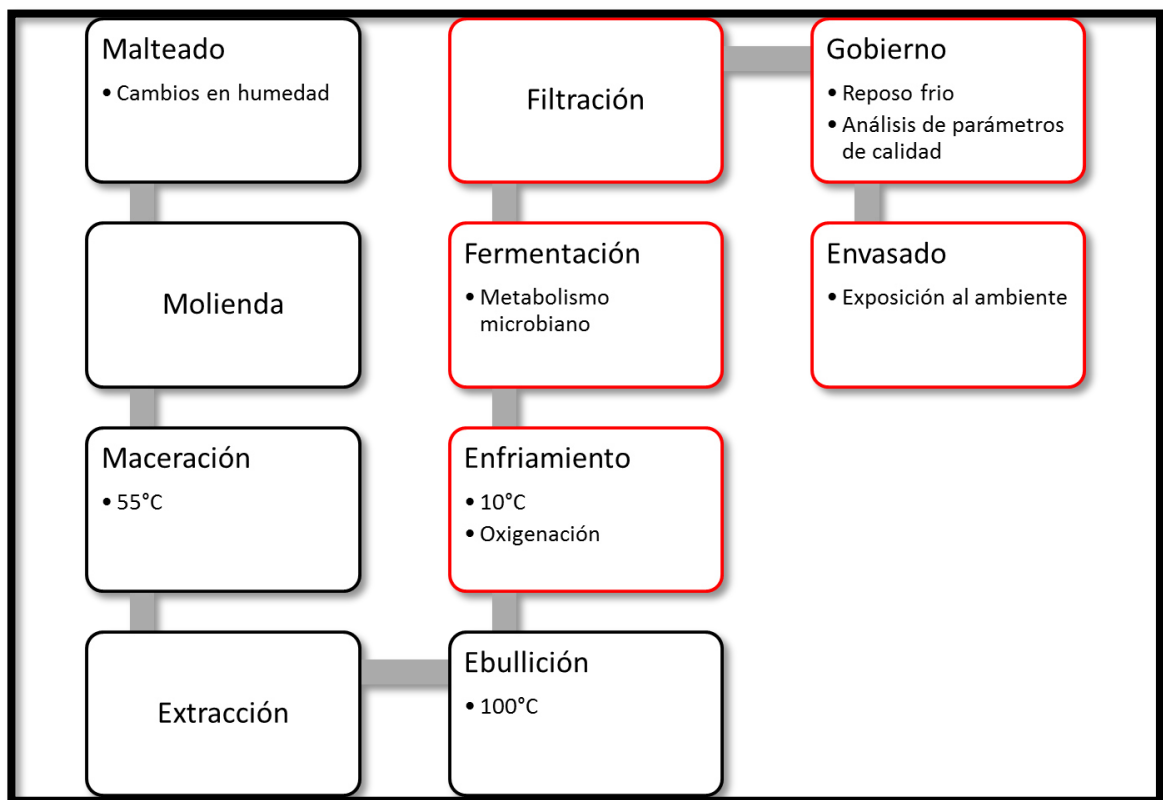


Figura 2. Etapas del proceso de elaboración de cerveza y cambios fisicoquímicos que ocurren en cada uno. En rojo se resalta la parte del proceso donde el mosto y la cerveza son más vulnerables a la contaminación bacteriana ya que después de la ebullición el mosto queda efectivamente estéril.

Los contaminantes del mosto más prevalentes son bacterias Gram negativo como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Escherichia* (Priest *et al.*, 1974). En el mosto estas bacterias producen DMS y ácidos orgánicos que dan a la cerveza un aroma y sabor frutal o vegetal desagradable. Las enterobacterias también pueden inhibir el crecimiento de *Saccharomyces*. Debido a que las enterobacterias son aeróbicas y no son sensibles a los ácidos del lúpulo por su morfología de Gram negativo, pueden crecer en los mostos oxigenados ricos en azúcares, pero son inhibidas fácilmente por el etanol y pH ácido de la cerveza, por lo que no son un problema de contaminación en cerveza terminada. El incremento de estándares de higiene y mejoramiento de equipos han convertido a las enterobacterias en visitantes indeseados pero no comunes en el mosto (Bokulich y Bamforth, 2013). Previamente a la etapa de fermentación, el mosto es enfriado y oxigenado para facilitar el crecimiento de *Saccharomyces* que convierte los azúcares del mosto en etanol y dióxido de carbono para obtener cerveza, el cual es un ambiente hostil para el crecimiento microbiano, donde solo un pequeño grupo de bacterias se pueden desarrollar (Suzuki, 2011). La fermentación puede tardar entre 7 y 14 días y seguido a esto la cerveza se reposa a temperaturas de 0 a 5°C durante 2 a 5 días.

### **Bacterias contaminantes de cerveza**

La mayoría de los incidentes de contaminación microbiológica de cerveza es causada por las BAL *Lactobacillus* y *Pediococcus*, abarcando hasta el 90 % de las contaminaciones reportadas (Bokulich y Bamforth, 2013; Garofalo *et al.*, 2015; Suzuki, 2011). Las BAL son prevalentes en la naturaleza y están asociadas con materia vegetal y humanos, entre otros ambientes; por lo que su entrada a las cervecerías es frecuente e inevitable y su amplia distribución en las cervecerías es incuestionable (Bokulich *et al.*, 2015). La entrada de bacterias contaminantes al proceso de elaboración de cerveza se puede dividir en contaminaciones primarias, las cuales se originan de las levaduras, el mosto o la fermentación y en contaminaciones secundarias las cuales ocurren en el



proceso de envasado de la cerveza terminada. Estos dos tipos de contaminación son igualmente frecuentes (Storgårds, 2000; Vaughan *et al.*, 2005), pero las consecuencias de una contaminación primaria pueden llegar a ser más extensas y desastrosas (Suzuki, 2011).

Las contaminaciones microbiológicas de la cerveza son causadas por bacterias que se encuentran en el equipo, en el aire o en la materia prima. Estos organismos pueden sobrevivir por mucho tiempo en nichos del proceso, probablemente fuera de la línea de producción sin causar signos de contaminación, entonces, estos microorganismos pueden contaminar todo el proceso a causa de fallas tecnológicas o limpieza insuficiente (Bokulich *et al.*, 2015; Storgårds, 2000) y estas contaminaciones no ocurren nunca de manera espontánea, si no que casi siempre son consecuencia de un crecimiento secuencial de microorganismos, primero bacterias ácido acéticas y algunas enterobacterias comienzan a crecer en lugares donde existen residuos intermediarios del proceso o cerveza. Estas bacterias no se consideran dañinas para el producto, pero debido a la formación de biopelículas protegen a microorganismos acompañantes de la desecación y desinfección. Si los productos residuales se encuentran presentes durante largos periodos de tiempo, levaduras salvajes comienzan a crecer y estas producen factores que promueven el crecimiento de BAL (Bokulich *et al.*, 2015; Bokulich y Bamforth, 2013; Vaughan *et al.*, 2005).

Las BAL son el principal contaminante de la cerveza debido a que por su fisiología pueden crecer en altas concentraciones de dióxido de carbono, pH ácido y en presencia de bajo contenido de etanol, pero afortunadamente el crecimiento de la mayoría de las BAL es inhibido en la cerveza por la actividad antibacterial de los ácidos del lúpulo (Bokulich y Bamforth, 2013; Suzuki, 2011). El pequeño grupo de BAL que se ha adaptado al crecimiento en la cerveza se debe principalmente por el desarrollo de tolerancia al lúpulo y son los microorganismos contaminantes de cerveza más prevalentes en la actualidad (Bokulich y Bamforth, 2013). Estos incluyen a *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P.*

*dextrinicus*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. claussenii*, *L. brevis*, *L. brevisimilis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. curvatus*, *L. coryneformis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. malfermentans*, *L. fructivorans*, *L. paucivorans*, *L. paracollinoides*, *L. amylophilus*, *L. lindneri* y *L. rossiae* (Bokulich y Bamforth, 2013; Corsetti *et al.*, 2005; Jespersen y Jakobsen, 1996; Suzuki, 2011; Vaughan *et al.*, 2005; Wieme *et al.*, 2014).

Además de BAL, muy pocas bacterias Gram positivo se han reportado en cerveza. Especies de la familia *Bacillaceae* no se consideraban como contaminantes de cerveza pero *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* y *Staphylococcus epidermidis* se han encontrado en cerveza artesanal con el gen de resistencia a lupulo *horA* (Haakensen y Ziola, 2008).

Entre las especies de lactobacilos, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus lindneri* son consideradas las mayores bacterias contaminantes de cerveza. *L. brevis* y *L. lindneri* son heterofermentativos y a estas especies pertenecen las cepas con la mayor habilidad de alterar la cerveza (Suzuki, 2011; Vaughan *et al.*, 2005).

Los *Lactobacillus* son bacilos Gram positivo, no esporulados, raramente móviles, anaerobio facultativo, catalasa negativo. Las células son en forma de bastón regular de 0.5 a 1.2 x 1 a 10 µm. Usualmente son bastones alargados pero algunas veces son casi cocoides, comúnmente en cadenas cortas. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 40 °C (Holt *et al.*, 1994) pero las BAL aisladas de ambientes cervecero comúnmente tienen temperaturas óptimas de crecimiento de 19 a 26 °C (Deng *et al.*, 2014; Suzuki *et al.*, 2005; Suzuki, 2011).

Seguido en importancia de *Lactobacillus* de acuerdo a la frecuencia de contaminación de cerveza, se encuentra *Pediococcus damnosus* (Bokulich y Bamforth, 2013). *Pediococcus* un género de bacterias homofermentativas, cocos Gram positivo, no esporulados, inmóviles, aerobio facultativo, catalasa negativo.

Las células son esféricas, nunca alargadas, de 1 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, forman tétradas bajo condiciones favorables, algunas veces solo se observan en pares. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 40 °C (Holt, 1994).

Estas BAL alteran la cerveza por medio de la acidificación, aumento de la turbidez y producción de diacetilo el cual imparte un aroma intenso a mantequilla. Algunas cepas pueden producir también exopolisacáridos en la cerveza lo que produce una consistencia aceitosa (Ziola, 2011). En particular, las especies contaminantes de *Pediococcus*, se caracterizan por alta producción de diacetilo y exopolisacáridos y por su habilidad para crecer a temperaturas bajas por lo que son muy comunes contaminantes de cervezas lager las cuales son fermentadas a baja temperatura (Jespersen y Jakobsen, 1996).

### **Habilidad de las bacterias para crecer en cerveza**

El factor que limita que microorganismos pueden crecer en cerveza es la presencia de los compuestos amargos del lúpulo; especialmente para las bacterias Gram positivas que toleran etanol y pH ácido. Los iso- $\alpha$ -ácidos del lúpulo que se producen durante la hirvición del mosto poseen propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivo (Suzuki et al., 2005; Suzuki, 2011). Estos ácidos del lúpulo son ácidos débiles que pueden atravesar la membrana citoplasmática de bacterias Gram positivo y una vez dentro de la célula actúan como protonoforos que disipan el gradiente de pH transmembranal y detienen la fuerza protón motriz (FPM) (Behr y Vogel, 2009). Por lo que es importante para las BAL como *Lactobacillus* y *Pediococcus* evitar la entrada de los compuestos del lúpulo a la célula. Se ha mostrado que el gene *horA*, identificado originalmente en *L. brevis*, confiere resistencia a lúpulo en BAL (Fig. 3) (Sakamoto et al., 2001; Sakamoto y Konings, 2003).

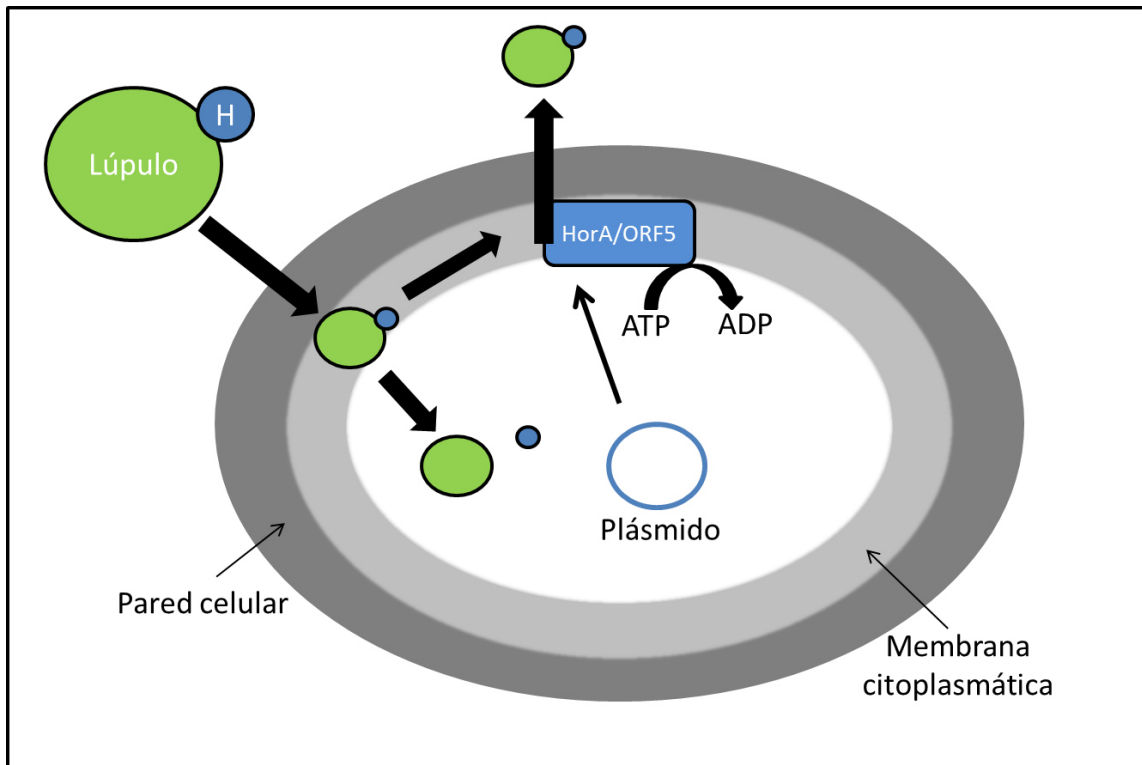


Figura 3. Representación del mecanismo de resistencia a lúpulo. Observamos como los genes *horA* y ORF5 confieren resistencia a los iso- $\alpha$ -ácidos. Donde las bacterias sensibles no poseen los transportadores de membrana encargados de evitar la entrada de los ácidos al citoplasma que liberan protones los cuales disipan la fuerza protón motriz necesaria para la síntesis de ATP.

Anteriormente se creía que la resistencia al lúpulo era una característica estable codificada en el DNA cromosomal (Fernandez y Simpson, 1993), pero en la actualidad se cree que puede ser una combinación de genes cromosomales (Behr *et al.*, 2015) y de plásmidos ya que muchas cepas cervceras de BAL adquieren gradualmente una resistencia aumentada a los compuestos del lúpulo a través de cultivación seriada en medios con un incremento en la concentración de ácidos del lúpulo (Sami *et al.*, 1997; Suzuki, 2011). A este fenómeno se le llama adaptación al lúpulo. Esto llevo al descubrimiento de que por lo menos en *L. brevis* ABBC45 un factor genético que confiere resistencia al lúpulo se encuentra en plásmido, el cual es una forma de DNA relativamente inestable. El análisis de secuencia de pRH45 reveló que poseía un marco abierto de lectura (ORF), al que se llamó *horA*. Este ORF codifica para una proteína de membrana, la cual tiene una secuencia

de aminoácidos con una identidad del 53% con Lmra (Sami *et al.*, 1997), la familia de transportadores multidrogas de casete de unión de ATP (ABC) identificado en *Lactococcus lactis* (Fath y Kolter, 1993). A partir de estos resultados se sugirió que HorA, el producto de *horA*, confiere resistencia a *L. brevis* ABBC45 funcionando como un transportador multidrogas que expulsa los ácidos del lúpulo fuera de la célula.

El gen de resistencia *horA*, se encuentra en un plásmido de 15.1 kpb llamado pRH45, localizado en *L. brevis* ABBC45 y las copias de éste aumentan con la adaptación al lúpulo de *L. brevis* (Sami *et al.*, 1997). Por lo tanto, este plásmido es uno de los factores genéticos que confiere resistencia al lúpulo en *L. brevis* ABBC45. Una variante de esta cepa, fue obtenida en cultivo seriado y se encontró que se inducía la pérdida de pRH45 en *L. brevis* ABBC45. A la variante sin el plásmido se le llamó ABBC45c. La resistencia al lúpulo de la cepa ABBC45c se vio muy disminuida en comparación con la cepa silvestre ABBC45. El fenotipo fue restablecido con introducción del plásmido; demostrando que pRH45 confiere resistencia al lúpulo a *L. brevis* ABBC45 (Suzuki, 2011).

HorA se expresó en *L. lactis* NZ9000 y esto aumentó la resistencia de la bacteria a los compuestos del lúpulo y otras sustancia citotóxicas (Sakamoto *et al.*, 2001). Gracias a estos estudios, ahora se sabe que HorA es una proteína de membrana de la familia de transportadores multidrogas ABC que confiere resistencia al lúpulo en BAL. Sin embargo *L. brevis* ABBC45c, una variante que había perdido *horA*, todavía mostraba una habilidad residual para alterar la cerveza, indicando la presencia de mecanismos de resistencia independientes de *horA* (Suzuki *et al.*, 2002).

Para encontrar los mecanismos de resistencia independientes de *horA* se estudió a *L. brevis* ABBC45c (Suzuki *et al.*, 2004). Por medio de una cultivación seriada a 37 °C, se obtuvo una variante que mostró una resistencia reducida a compuestos del lúpulo. Esta variante, llamada ABBC45cc, había perdido totalmente la habilidad para crecer en cerveza. La caracterización genética de

*L. brevis* ABBC45cc, reveló que una porción de 12.6 kb había sido eliminada de un plásmido de 23.4 kb llamado pRH45II (Suzuki *et al.*, 2004). La región ausente de pRH45II contenía 12 ORFs y se asumió que el segundo gen de resistencia al lúpulo se encontraba en esta región. Por el otro lado, el análisis bioquímico de la cepa ABBC45c indicó que el mecanismo independiente de *horA* esta mediado por un transportador multidrogas dependiente de la FPM (Suzuki *et al.*, 2002).

La caracterización genética de la región ausente de pRH45II demostró que el ORF5 codifica para una proteína con 11 a 12 dominios transmembranales, lo cual es una característica de los transportadores multidrogas dependientes de la FPM. Esto llevo a la evaluación de la presencia o ausencia del ORF5 en 29 cepas cerveceras de *L. brevis*. El ORF5 se encontró en las 29 cepas cerveceras mientras que estaba ausente en las 8 no cerveceras de este estudio (Suzuki *et al.*, 2004).

Intentos de obtener una cepa que no altera la cerveza de *L. lindneri* DSM 20692 dió nueva información acerca de la región de DNA ausente en pRH45II. No se habían encontrado cepas sensibles al lúpulo de *L. lindneri* pero recientemente se adquirió por cultivo seriado a 30 °C una variante sensible de *L. lindneri* DSM 20692, llamada DSM 20692NB (Suzuki *et al.*, 2005). El análisis de esta cepa demostró que no solo era sensible al lúpulo sino que también poseía resistencia disminuida a múltiples drogas no relacionadas estructuralmente con los ácidos del lúpulo. Este resultado sugirió que la resistencia de *L. lindneri* DSM 20692 está dada por un transportador multidrogas. Un análisis posterior mostró que la cepa DSM 20692 contiene homólogos de los ORF1 y ORF2, que se habían identificado originalmente en la región ausente de pRH45II. Estos ORFs en *L. lindneri* DSM 20692 se encuentran un plásmido de alto peso molecular y además se perdieron junto con la resistencia al lúpulo de esta cepa. De estas observaciones, se concluyó que el ORF1 y ORF2 están implicados en la resistencia independiente de *horA* y se les renombró *horB* y *horC*, los cuales codifican para un potencial regulador

de transcripción de genes para proteínas de transporte y para una proteína transportadora multidrogas dependiente de FPM, respectivamente (Suzuki *et al.*, 2005). Este tipo de genes siempre se han encontrado en plásmidos (Bergsveinson *et al.*, 2015) lo que les confiera alta movilidad entre bacterias de un mismo nicho ecológico (Bokulich *et al.*, 2015; Suzuki, 2011).

Además del uso de proteínas transportadoras para la resistencia al lúpulo, se ha observado que las BAL que pueden crecer en cerveza, una vez que se encuentran en presencia de lúpulo, aumentan su función de ATPasa para la translocación de protones, lo que contrarresta el efecto de los ácidos del lúpulo (Sakamoto *et al.*, 2002) y se han encontrado otros genes cromosomales que podrían estar implicados en la capacidad de crecer en cerveza de BAL (Behr *et al.*, 2015), así como *hitA*, el cual codifica para un transportador de cationes que se sobreexpresa en células resistentes al lúpulo, lo que facilita el transporte de manganeso al interior de la célula aun y con la disipación del gradiente de protones causado por los iso- $\alpha$ -ácidos (Bokulich y Bamforth, 2013). Es por esto que resulta importante la detección de los genes de resistencia a lúpulo en plásmido, así como la identificación de la especie bacteriana.

### **Detección de bacterias contaminantes**

Debido a la distribución extendida de bacterias contaminantes de cerveza en el ambiente cervecero, todas las etapas en la producción necesitan un monitoreo ocasional de microorganismos para asegurar la calidad del producto. Este monitoreo ayuda a indicar fallas en el proceso o el desarrollo de pobres condiciones de higiene. Mientras que no existen especificaciones oficiales para el número permitido de microorganismos presentes en cerveza, es generalmente aceptado que hasta el más mínimo número de microorganismos capaces de crecer en la cerveza constituye un riesgo debido al largo proceso de elaboración y la vida de anaquel de la cerveza (Jespersen y Jakobsen. 1996).

Las cervecerías normalmente dependen de métodos clásicos de cultivo combinados con caracterización fenotípica básica de los aislados. El procesamiento de la muestra depende del microorganismo que se busca, la etapa de producción y los recursos disponibles. Este proceso normalmente involucra la recolección de células de las muestras mediante filtración por membrana seguido de inoculación en medios selectivos y no selectivos. Existen diversos medios de cultivo para bacterias que alteran la cerveza, la convención cervecera de Europa recomienda para *Lactobacillus* y *Pediococcus* medio MRS (de Man, Rogosa y Sharpe), Raka-Ray y UBA (agar universal de cerveza). Ninguno de estos medios son adecuados para detectar todas las cepas, pero una combinación de estos da buenos resultados. Seguido a la detección de los microorganismos en estos medios, se necesita la identificación de la especie. Además de las pruebas básicas de morfología colonial, morfología celular, tinción Gram y prueba de catalasa, también se pueden realizar pruebas como fermentación de azúcares y análisis cromatográfico de ácidos orgánicos. Igualmente, se pueden utilizar métodos específicos de detección e identificación como inmunoensayos (Whiting *et al.*, 1999), PCR y qPCR (Haakensen *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2005; Suzuki, 2011; Ziola, 2007).

Aun y cuando se utilicen técnicas de detección e identificación rápidas como el qPCR, es necesario realizar cultivos de enriquecimiento ya que los generalmente los niveles de contaminación son muy bajos en la cerveza y es necesario poder detectar la mínima cantidad posible de células en la muestra. Para esto se utilizan medios de enriquecimiento que nos permiten obtener un número suficiente de células para su identificación. Sin embargo, uno de los aspectos más difíciles de las pruebas de calidad en las cervecerías es que muchas bacterias que contaminan la cerveza no crecen bien en los medios de cultivo utilizados en el laboratorio (Suzuki *et al.*, 2008). Por ejemplo, las cepas que crecen en cerveza de *L. lindneri* y *L. paracollinoides* generalmente pasan sin ser detectadas en los medios de control de calidad, como el MRS, el cual es usado ampliamente para el cultivo de BAL. Por el contrario, algunas cepas de estas bacterias que inicialmente mostraron lento crecimiento en medio MRS en



el momento del aislamiento, gradualmente adquirieron un crecimiento más rápido cuando fueron cultivadas de manera repetida en medio MRS. Además, se observa que *L. lindneri* y *L. paracollinoides* crecían mejor cuando el medio de cultivo es suplementado con cerveza, indicando que estas especies de bacterias están muy bien adaptadas al ambiente cervecero (Suzuki, 2011).

Después de la detección e identificación, para algunas especies es necesario comprobar si la bacteria puede alterar la cerveza. Las BAL incluyen cepas que tienen la habilidad de alterar la cerveza y cepas que no lo pueden hacer (Suzuki *et al.*, 2006). Anteriormente, el único método disponible para detectar esta habilidad era la “prueba forzada”. En esta prueba la bacteria era inoculada en cerveza o cerveza enriquecida. Sin embargo, esta prueba está lejos de ser práctica para aseguramientos de calidad ya que se ocupan varias semanas o hasta meses para tener resultados concluyentes. Procedimientos más rápidos se han desarrollado. La identificación de cepas se puede realizar a nivel genómico amplificando regiones exclusivas de cada especie del gen de RNA ribosomal 16S (Iijima *et al.*, 2008). Otra manera es determinar una propiedad fisiológica responsable de la alteración de la cerveza, como en el caso de las BAL en las cuales el denominador fisiológico es la resistencia a los compuestos del lúpulo que permite a estas bacterias crecer en cerveza. Sin embargo, medir la resistencia al lúpulo cultivando estos microorganismos en medio con lúpulo toma mucho tiempo por lo que es más rápido detectar por PCR los genes responsables de la resistencia al lúpulo y regiones específicas del gen para el rRNA 16S (Bokulich *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2005, 2006).

## DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Aun y cuando la cerveza es una bebida microbiológicamente estable, existen incidentes de contaminación microbiológica en la industria cervecera causando alteraciones al aspecto y sabor de esta bebida lo cual ocasiona una disminución en la calidad del producto y por consecuencia generando pérdidas para la empresa. Estas alteraciones son causadas principalmente por bacterias de los géneros, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Estos dos géneros son responsables de hasta el 90% de los casos de contaminación, por lo que se consideran los principales agentes de alteración del producto en la industria cervecera (Suzuki. 2011).

México en el 2015 se encontraba en quinto lugar de producción mundial de cerveza con 7,450,000 kilolitros (Kirin Beer university report 2016). Para evitar contaminaciones bacterianas en la producción y asegurar la calidad de la cerveza, es necesario conocer en que partes del ambiente cervecero se encuentran bacterias que puedan contaminar las distintas etapas del proceso de elaboración de cerveza. De esta manera podremos comprender de mejor manera como inician las contaminaciones bacterianas y así tratar de evitar futuras contaminaciones implementando nuevos controles de calidad.

## HIPÓTESIS

Existen diversas especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* habitando el ambiente cervecero que ocasionan contaminación en el proceso de elaboración de cerveza y pueden transmitir genes de resistencia a lúpulo de manera horizontal.

## OBJETIVOS

### General:

- Identificar cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* aisladas de un ambiente cervecero.

### Específicos

- Aislar e identificar cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* presentes en un ambiente cervecero.
- Detectar la presencia de los genes *horA* y ORF5 en cepas aisladas.
- Identificación de cepas aisladas por amplificación, secuenciación y análisis de restricción del gen rRNA16S.
- Determinar la distribución de las cepas aisladas y los genes *horA* y ORF5 en el proceso de elaboración de cerveza.
- Comprobar la transferencia horizontal de un gen de resistencia a lúpulo en las cepas aisladas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Aislamiento de cepas bacterianas**

Utilizamos técnicas estándar para el aislamiento de BAL del ambiente cervecero, tomamos muestras de aire y superficies de cuatro áreas distintas del proceso de elaboración de cerveza; fermentación, filtración, reposo y envasado. Las muestras de aire se tomaron dejando 15 min cajas Petri expuestas al ambiente con agar NBB (Döhler, Darmstadt, Alemania), mientras que las muestras de superficie se tomaron con un hisopo húmedo en área de 10 x 10 cm y posteriormente sembrado en agar NBB. El agar NBB se preparó con pH 5.6 y se incubó después de la toma de muestras hasta 3 semanas en anaerobiosis a 25° C de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las colonias fueron parcialmente identificadas utilizando las líneas taxonómicas descritas en el manual Bergy's (Holt, 1994), además de observación en microscopio óptico y electrónico de barrido. Los aislados de BAL se subcultivaron en medio MRS modificado (Difco, Maryland, EE.UU.) en anaerobiosis a 25°C y pH 4.8 por 7 días (Deng *et al.*, 2014) hasta obtener cultivos puros. Las muestras de superficie también se sembraron en agar LB (Difco, Maryland, EE.UU.) e incubado a 37°C por 3 días, las colonias de bacilos Gram positivo se probaron para esporulación en DSM (Difco, Maryland, EE.UU.) a 37°C. Las cepas de BAL aisladas se mantuvieron en caldo y agar MRS a 4°C hasta su uso.

### **Habilidad de crecer en cerveza de cepas aisladas**

Para evaluar la capacidad de crecer en cerveza de las cepas aisladas, se tomaron  $1 \times 10^5$  UFC de cada cepa y se inocularon en 15 ml de cerveza comercial filtrada con 14 a 18  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de iso- $\alpha$ -ácidos y 3.5 % v/v de etanol. La cerveza fue incubada en anaerobiosis a 25°C durante 30 días (Deng *et al.*,

2014; Iijima *et al.*, 2007). El crecimiento bacteriano se determinó por la densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) (Mallette, 1969).

### **Amplificación y detección de genes de interés**

Para la amplificación por PCR de los genes de resistencia a lúpulo *horA* y ORF5, y el gen rRNA16S (Tabla I), diseñamos iniciadores utilizando las herramientas disponibles en la página de internet del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/site>) y en EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>), donde se tomó en cuenta la especificidad de los iniciadores, el tamaño del amplicón, temperatura de alineamiento, formación de estructuras secundarias así como homodímeros y heterodímeros. Para el gen *horA*, utilizamos como template las secuencias JX398144.1, AB218963.1 y AB279601.1 y para el gen rRNA16S las secuencias NR\_029308.2, NR\_075024.1, EF120367.1, NR\_102772.1, CP006033.1, NR\_042087.1 y NR\_025388.1. Los iniciadores para el gen ORF5 se tomaron de un reporte previo de Suzuki *et al.* (2005).

Tabla I. Iniciadores para la amplificación por PCR de genes seleccionados.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm*	Gen	Producto (bp)
<b>horAFW</b>	ACCGAATTCACCCCGTTAC	57.3	<i>horA</i>	892
<b>horARV</b>	TGGATTTCGAGTGGTTGAGCC	57.3		
<b>AORF5F</b>	CATTGGCCTTGGCTTACT	52.7	ORF5	1623
<b>AORF5R</b>	AGGTTTTGAACGGTAATC	47.1		
<b>rRNA16SF</b>	GCCACATTGGGACTGAGACA	57.4	rRNA16S	1215
<b>rRNA16SR</b>	GCAGGTTCTCCTACGGCTAC	57.3		

\*Temperatura de alineamiento.

Para detectar y amplificar los genes de interés mediante PCR, purificamos el DNA a partir de cultivos puros de las cepas aisladas, tomamos una sola colonia del medio solido con el asa bacteriológica estéril para resuspender en 100 µl de agua bidestilada estéril en un tubo de microcentrifuga; posteriormente se agregó 100 µl de cloroformo / alcohol isoamilico en proporción 24:1, después de agitar en vortex por 5 s, la mezcla fue centrifugada a 14,000g por 5 min. Se tomaron de 10 a 15 µl de la fase superior acuosa como fuente de DNA para las pruebas de PCR (Ruiz-Barba *et al.*, 2005). La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Veriti de 96 pocillos de Applied biosystems; utilizando 10 µl de buffer de reacción 5X GoTaq (Promega, Wisconsin, EE.UU.), 1 µl de dNTPs al 10 mM, 1 µl del iniciador directo y 1 µl del iniciador reverso a 50 µM cada uno, 1.25 unidades de GoTaq DNA polimerasa (Promega, Wisconsin, EE.UU.), 0.5 µg de DNA muestra y agua para un volumen de reacción final de 50 µl. El PCR se realizó con 1 ciclo a 95°C por 5 min para la desnaturalización inicial, 35 ciclos a 95°C por 30 s para

desnaturalización, 50 a 57 °C por 1 min para el alineamiento de los iniciadores, 72°C por 2 min para la extensión y 1 ciclo a 72°C por 5 min para la extensión final. Para visualizar los productos de la amplificación, cargamos 5 µl de la reacción de PCR en gel de agarosa al 1% para electroforesis a 70 V/cm<sup>2</sup> durante 60 min y teñido con GelRed (Biotium, California, EE.UU.). Se utilizó un marcador de tamaño molecular de DNA en escalera de 50 bp (Promega, Wisconsin, EE.UU.). Las bandas de DNA se purificaron con el kit Wizard SV PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) para su secuenciación en el equipo AB 3500 (Applied Biosystems, California, EE.UU.) por el laboratorio Vitagénesis SA de CV (Monterrey, México). El análisis de las secuencias se llevó a cabo con las herramientas disponibles en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los productos de PCR fueron sometidos a digestión por la enzima *Bfa*I (FspBI) (Thermo scientific, Massachusetts, EE.UU.); agregando 1 µl de la enzima a 10 µl de la reacción de PCR, además de 18 µl de agua y 2 µl de buffer 10X Tango, esto se incubó durante 2 horas a 37°C. El DNA digerido se observó en gel de agarosa como fue descrito previamente.

### **Transferencia horizontal del gen *horA***

Para comprobar la transferencia de genes de resistencia a lúpulo, realizamos un cocultivo con la cepa de *Pediococcus* PS01 con el gen *horA* y *Lactobacillus* MA01 sin el gen de resistencia a lúpulo. Inoculamos 1 x 10<sup>5</sup> células de cada una de estas dos cepas en 10 ml de caldo MRS a 25°C durante 5 días en anaerobiosis. Posteriormente se inoculó una gota de este cocultivo en agar MRS por estría cruzada hasta obtener colonias aisladas de *Lactobacillus* MA01 (MA01a) las cuales fueron inoculadas nuevamente en caldo MRS para su posterior extracción de DNA. Este proceso se realizó por triplicado. Realizamos PCR para el gen *horA* de *Lactobacillus* MA01 original, así como al cocultivado y a *Pediococcus* PS01 como se detalló anteriormente.

## RESULTADOS

### Aislamiento de cepas bacterianas y habilidad para crecer en cerveza

Logramos aislar diez cepas de BAL de superficies y aire ambiente de una cervecería con capacidad de crecer en cerveza (Tabla II, Fig. 4). Todas las cepas son Gram positivo y catalasa negativo con morfología de cocos o bacilos (Fig. 5,6). También aislamos un *Bacillus* sp. pero sin capacidad de crecer en cerveza (Fig. 5).

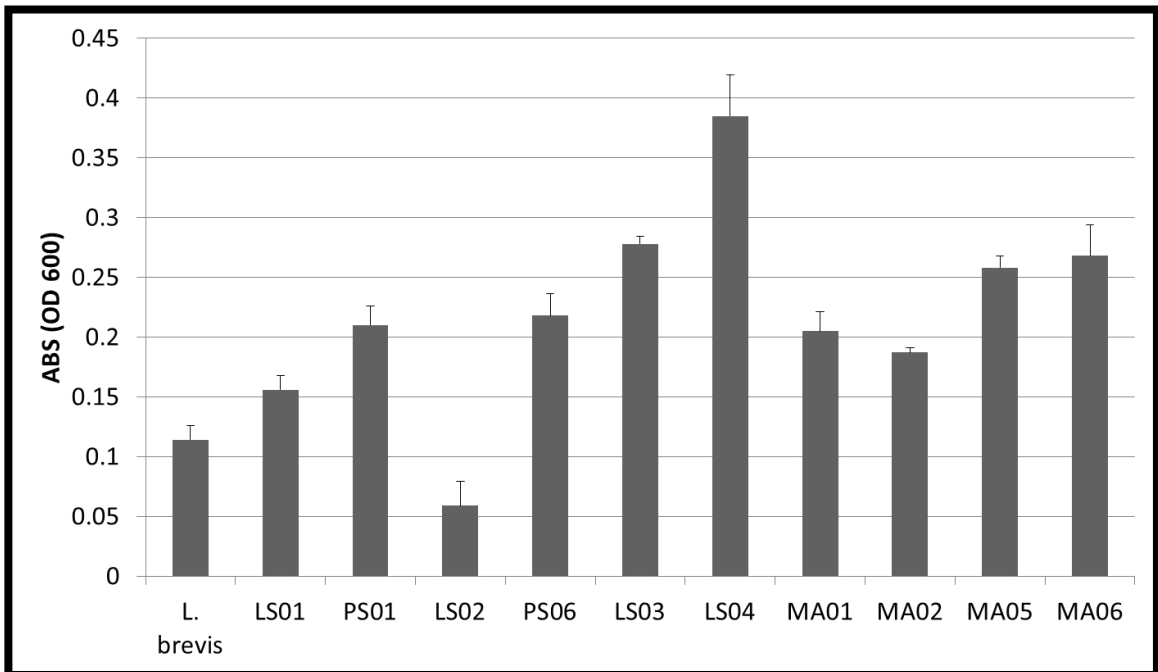


Figura 4. Crecimiento bacteriano de las cepas aisladas en cerveza con 14 a 18  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de iso- $\alpha$ -ácidos y 3.5 % de etanol después de incubación de 30 días a 25°C. La cepa MA08 no creció en cerveza.



Tabla II. Cepas bacterianas aisladas del ambiente cervecero.

Cepa	Bacteria	Etapas de muestreo	Crecimiento en cerveza	horA (GenBank)	ORF5 (GenBank)
Referencia	<i>Lactobacillus brevis</i>	ND	+	+	-
				(KP972093)	
LS01	<i>Lactobacillus rossiae</i>	Fermentación (S)	+	+	+
				(KP972091)	(KR011860)
PS01	<i>Pediococcus damnosus</i>	Fermentación (S)	+	+	+
				(KP972090)	(KR011859)
LS02	<i>Lactobacillus rossiae</i>	Fermentación (S)	+	+	-
				(KP972092)	
PS06	<i>Pediococcus damnosus</i>	Reposado (S)	+	+	-
LS03	<i>Lactobacillus brevis</i>	Fermentación (S)	+	-	+
					(KR011862)
LS04	<i>Lactobacillus brevis</i>	Fermentación (S)	+	+	-
				(KP972094)	
MA01	<i>Lactobacillus brevis</i>	Embotellado (A)	+	-	-
MA02	<i>Lactobacillus rossiae</i>	Embotellado (MA)	+	-	+
					(KR011861)
MA05	<i>Lactobacillus casei</i>	Fermentación (MA)	+	+	-
MA06	<i>Lactobacillus casei</i>	Fermentación (MA)	+	+	-
MA08	<i>Bacillus</i> sp.	Embotellado (S)	-	+	-
				(KY190220)	

\*(S) Superficie, (MA) aire ambiente.

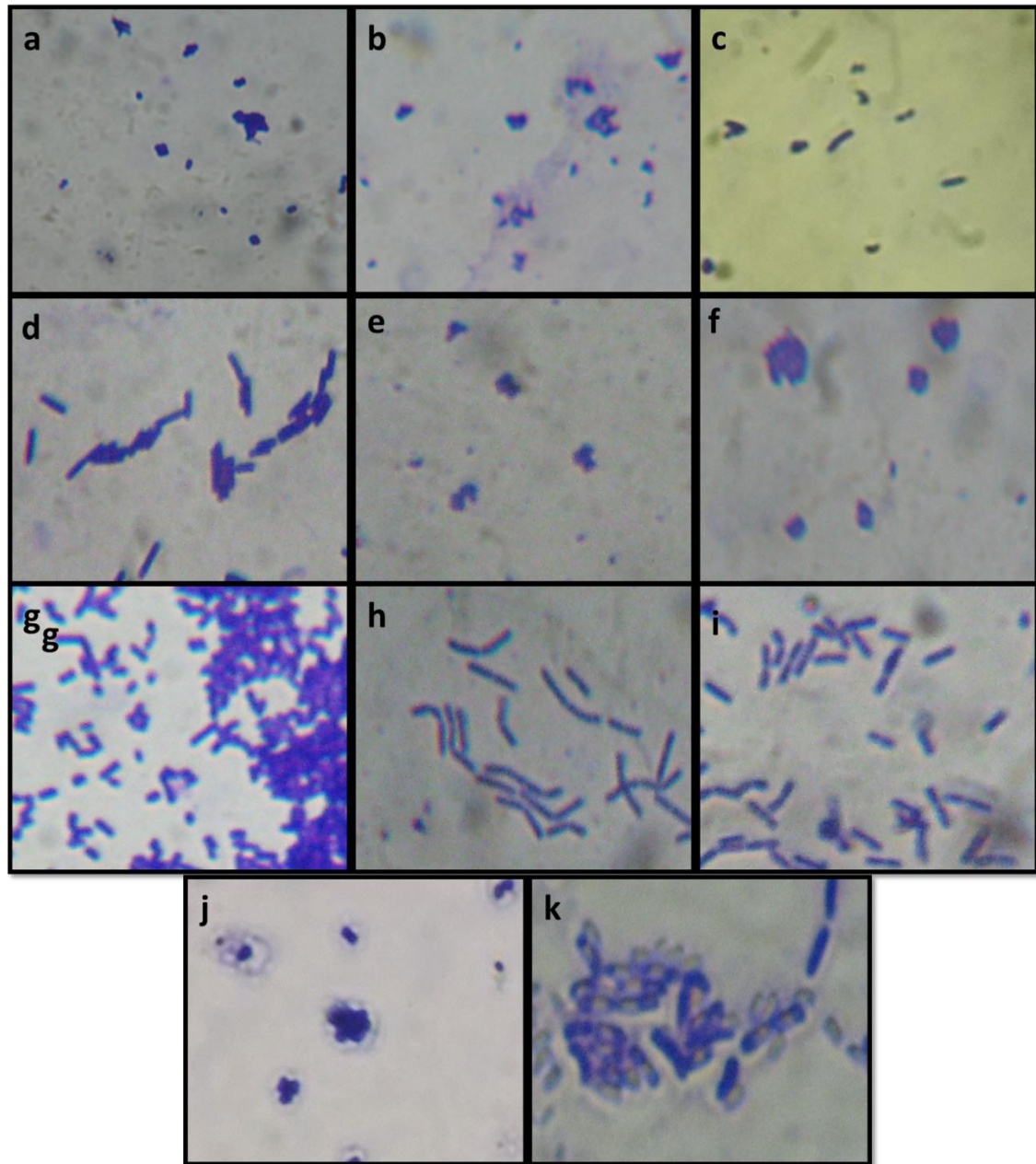


Figura 5. Fotografías al microscopio óptico de las cepas aisladas del ambiente cervecero. a) PS01 cocos en tétrada Gram +, b) LS02 Bacilos cortos Gram +, c) LS03 bacilos Gram +, d) MA01 bacilos Gram +, e) MA02 bacilos cortos Gram +, f) LS01 bacilos cortos Gram +, g) LS04 bacilos Gram +, h) MA05 bacilos Gram +, i) MA06 Bacilos Gram +, j) PS06 cocos en tétradas Gram -, k) MA08 bacilos esporulados Gram +.

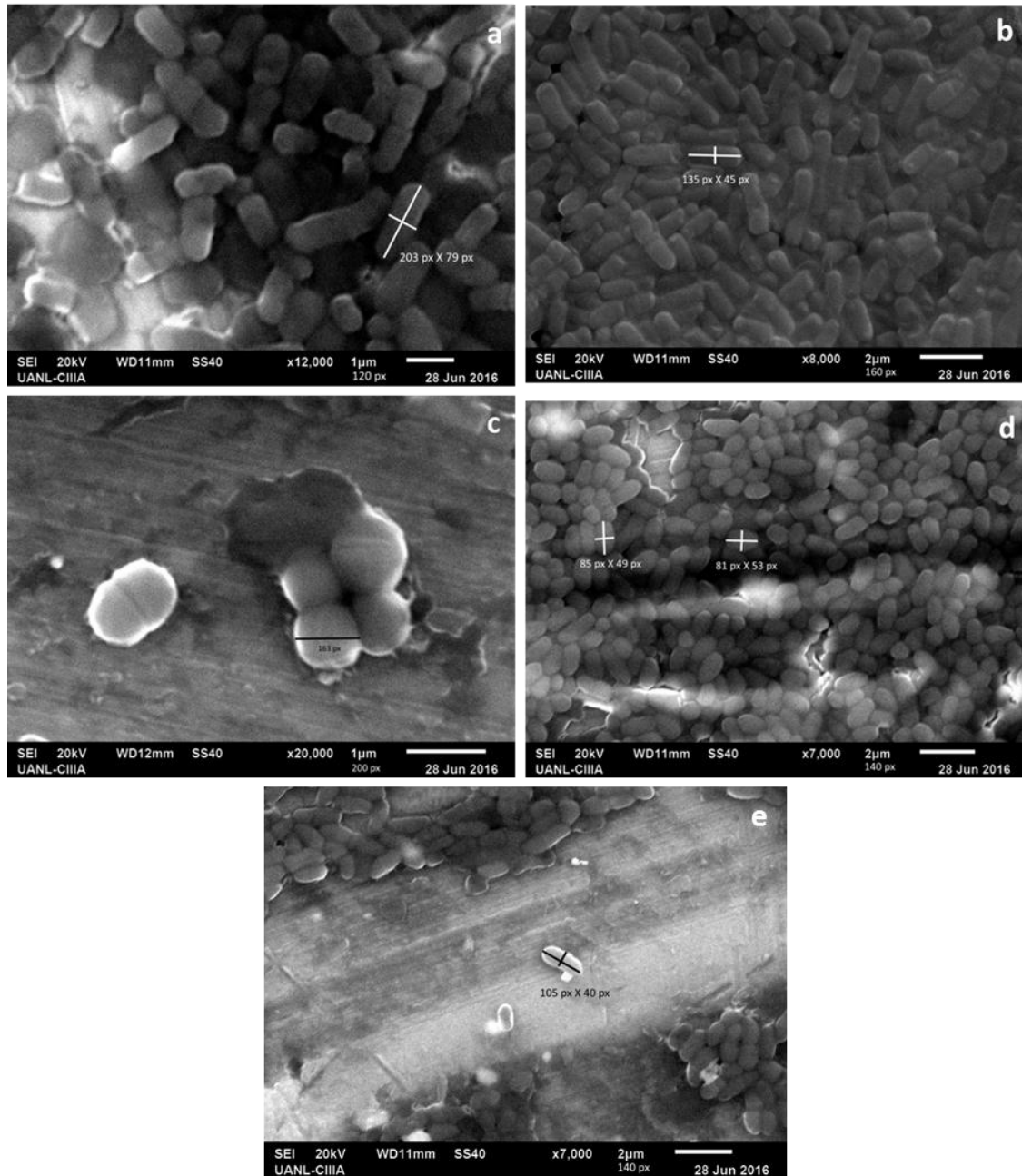


Figura 6. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de a) *Lactobacillus brevis* LS04, b) *Lactobacillus casei* MA06, c) *Pediococcus damnosus* PS01, d) *Lactobacillus rossiae* MA02 y e) *Lactobacillus rossiae* LS02.

## Amplificación y detección de genes de interés

Detectamos genes de resistencia a lúpulo en diez de las cepas aisladas, ocho de las cuales fueron positivas para el gen *horA* y cuatro para ORF5 (Tabla II, Fig. 7a). La comparación de secuencias de *horA* (KP972090-KP972094, KY190220) poseen una identidad de más del 99% entre ellos y con la base de datos del NCBI y su patrón de digestión con *Bfal* mostro el mismo patrón (Fig. 7b). De la misma manera que *horA*, la secuencia de ORF5 (KR011859-KR011862) también mostro identidad de al menos 99% entre ellos y la base de datos del NCBI.

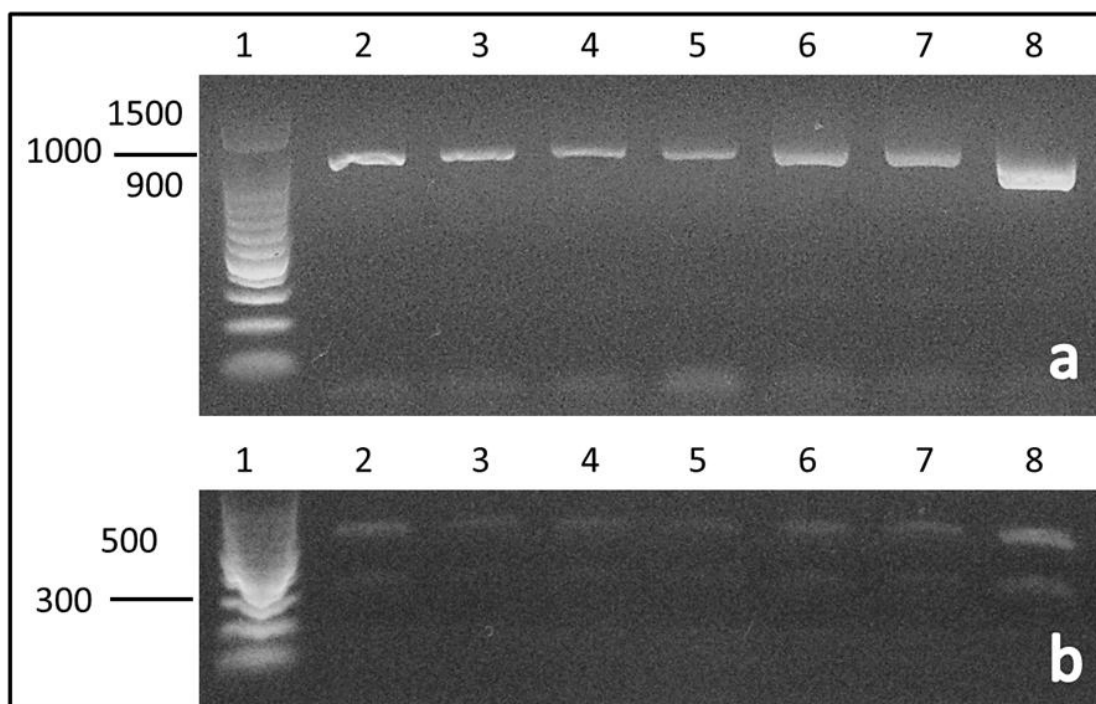


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa con los fragmentos de PCR para a) *horA* y b) restricción de *horA* con *Bfal*. En los carriles 1) marcador de tamaño molecular (bp), 2) PS01, 3) LS01, 4) LS02, 5) LS04, 6) MA05, 7) MA06 y 8) PS06.

Basado en la secuenciación de DNA y los patrones de restricción con la endonucleasa *BfaI* de los fragmentos amplificados del gen rRNA16S (KY033147- KY033150) de las cepas aisladas, ocho fueron identificados como especies de *Lactobacillus*, dos de *Pediococcus* y una de *Bacillus* (Tabla II, Fig. 8, 9).

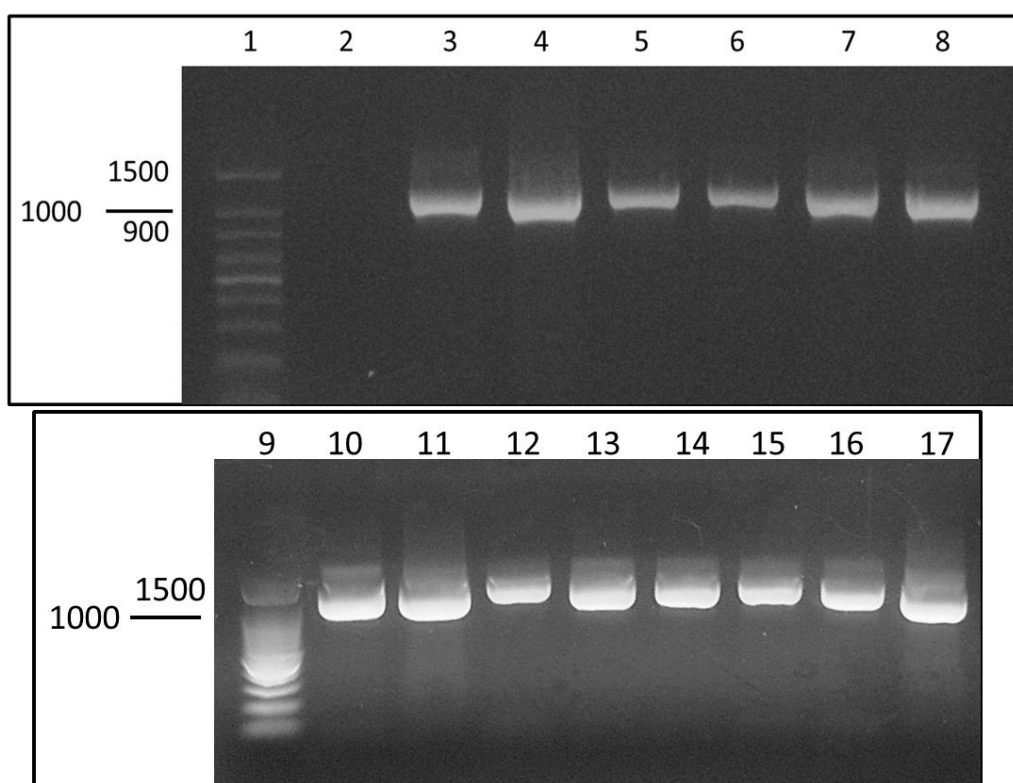


Figura 8. Gel de agarosa con fragmentos amplificados del gen rRNA16S. Observamos en carriles 1) Marcador de tamaño molecular (bp), 2) control negativo, 3) PS01, 4) PS02, 5) PdR, 6) LS04, 7) MA05, 8) MA06, 9) Marcador de tamaño molecular (bp), 10) *L. brevis*, 11) PS01, 12) MA08, 13) PS02, 14) LS03, 15) MA01, 16) PS06 y 17) LS01.

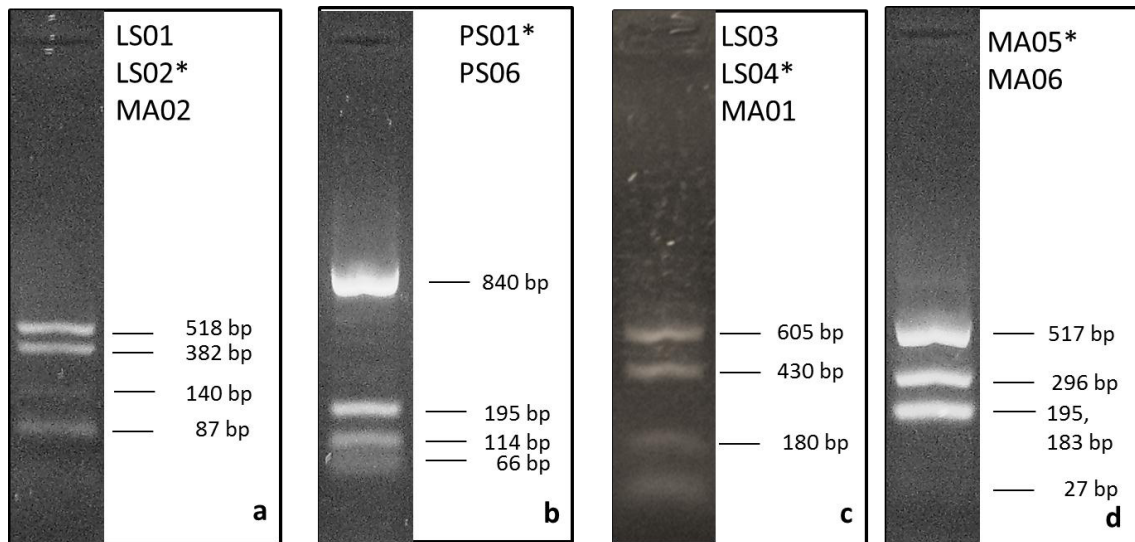


Figura 9. Patrón de restricción de la endonucleasa *BfaI* en los fragmentos amplificados del gen rRNA16S por PCR de las cepas aisladas en electroforesis en gel de agarosa al 1 %. a) *Lactobacillus rossiae*, b) *Pediococcus damnosus*, c) *Lactobacillus brevis* y d) *Lactobacillus casei*. \*El producto de PCR fue secuenciado.

### Transferencia horizontal del gen *horA*

Logramos detectar el gen *horA* por PCR en las cepas de *Lactobacillus* MA01a las cuales fueron cocultivadas con *Pediococcus* PS01 en las 3 repeticiones del ensayo (Fig. 10).

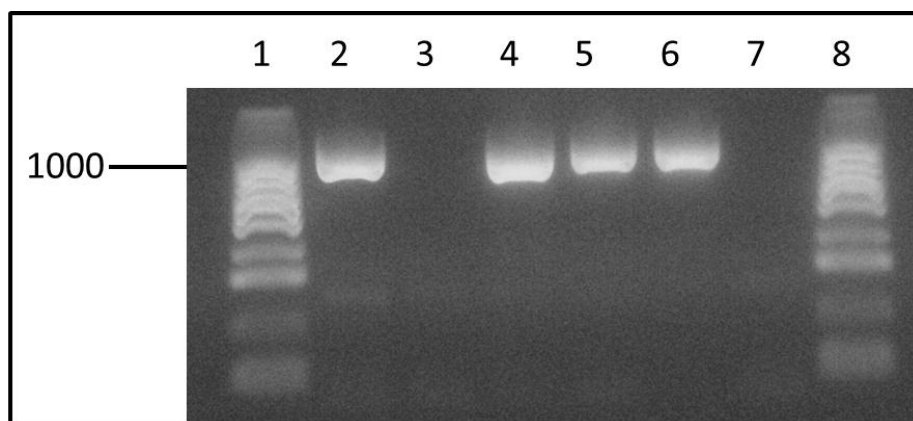


Figura 10. Gel de agarosa con fragmentos amplificados del gen *horA*. Observamos en los carriles 1) Marcador de tamaño molecular (bp), 2) PS01, 3) MA01, 4) MA01a1, 5) MA01a2 6) MA01a3, 7) Blanco y 8) Marcador de tamaño molecular (bp).

## DISCUSIÓN

Las mayoría de las cepas aisladas de ambiente de elaboración de cerveza pertenecieron a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* con ocho y dos cepas respectivamente, lo que concuerda con reportes previos que muestran que la mayoría de los incidentes de contaminación de cerveza ocurren por especies del género *Lactobacillus* (Garofalo *et al.*, 2015; Suzuki, 2011). Todas las cepas aisladas de BAL mostraron habilidad de crecer en cerveza (Fig. 4), pero solo en nueve de estas se encontraron genes de resistencia a lúpulo (Tabla II). No detectamos genes de resistencia a lúpulo en la cepa MA01, pero aun así pudo crecer en cerveza; esto se puede deber a la presencia de otros genes de resistencia como el *horC*, o a genes cromosomales propios de la cepa (Behr *et al.*, 2015; Suzuki, 2011).

El ORF5 fue detectado en 4 cepas mientras que el gen *horA* en diez cepas, incluyendo la cepa de *Bacillus* MA08; de la cual solo existen pocos reportes (Haakensen y Ziola, 2008). Aun y cuando esta cepa no pudo crecer en cerveza, podría representar un reservorio de genes de resistencia a lúpulo (Bokulich *et al.*, 2015).

El alineamiento de la secuencia de los fragmentos amplificados del gen *horA* (KP972090-KP972094, KY190220) mostró más del 99% de identidad entre ellos, así como la digestión con la endonucleasa *Bfal* mostro el mismo patrón; de la misma manera, el alineamiento de las secuencias de ORF5 (KR011859-KR011862) mostró más del 99 % de identidad. Estos resultados sugieren que los genes se pueden estar transfiriendo de manera horizontal entre cepas bacterianas residentes del ambiente cervecero y las cepas de BAL que entran por el aire, la materia prima o el personal (Bergsveinson *et al.*, 2015; Bokulich *et al.*, 2015; Bokulich and Bamforth, 2013; Suzuki, 2011).

Los productos de PCR del gen rRNA16S fueron digeridos con la endonucleasa *Bfal* lo que resulto en cuatro patrones diferentes para todas las

BAL aisladas (Fig. 9). La secuencia de DNA de cada uno de los patrones de restricción mostro 99 % de identidad con *L. rossiae* (KY033150), *P. damnosus* (KY033147), *L. brevis* (KY033148) y *L. casei* (KY033149) (Fig. 11), siendo todos previamente reportados como contaminantes de cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013; Wieme *et al.*, 2014). La secuencia del gen rRNA16S correspondiente al patrón de restricción de las cepas LS01, LS02 y MA02 posee un 99 % de identidad con *L. rossiae*. Esta bacteria no es muy comúnmente reportada como contaminante de cerveza (Wieme *et al.*, 2014) y además en el presente estudio resulto problemática la identificación por métodos tradicionales debido a la morfología de bacilo corto (Fig. 6) que puede ser interpretada por cocos en el microscopio óptico. Esta morfología puede deberse al ambiente estresante que presenta la cerveza y los medios de cultivo selectivos (Asano *et al.*, 2007; Suzuki, 2011). Debido a esto, cuando se están identificando bacterias contaminantes de cerveza no siempre se puede confiar totalmente en la morfología aparente, así que con un proceso simple de PCR y análisis de restricción como el utilizado en este trabajo se puede corroborar la identificación de nuevas bacterias potencialmente contaminantes de cerveza que podrían eludir los kits de detección.



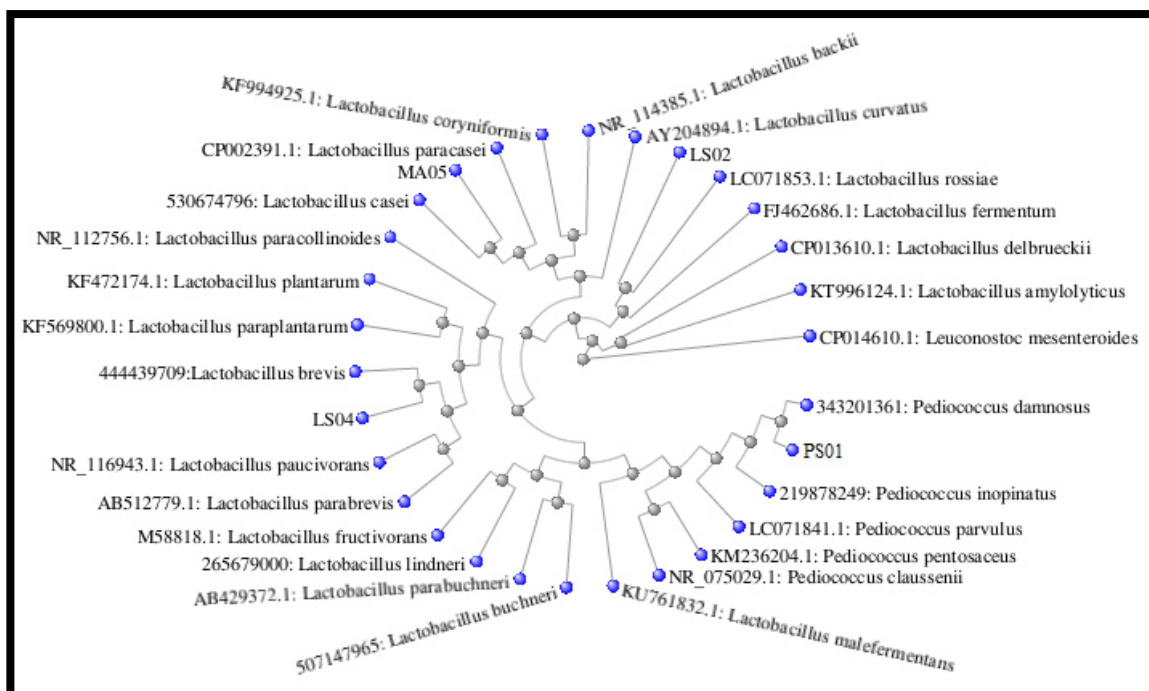


Figura 11. Relación de identidades por el método de "Neighbor joining" de la secuencia del gen rRNA16S de cuatro cepas aisladas, LS04 (KY033148), LS02 (KY033150), PS01 (KY033147) y MA05 (KY033149); además de las bacterias contaminantes de cerveza más comúnmente reportadas.

Si visualizamos las especies bacterianas aisladas en este trabajo de las diferentes etapas del proceso de elaboración de cerveza (Fig. 12), es posible que las cepas PS01 y PS06, las dos *P. damnosus* pero una aislado del área de fermentación y la otra de una etapa posterior en el proceso, podrían ser la misma cepa moviéndose a través del proceso de elaboración de cerveza donde podría estar ganando o perdiendo genes de resistencia a lúpulo por transferencia horizontal con otras bacterias de ambiente (Bokulich *et al.*, 2015) como se demostró que podría suceder en este trabajo por la transferencia del gen *horA* de la cepa PS01 a la cepa MA01 cuando crecieron en el mismo espacio (Fig. 10). Otro caso similar fue el de las cepas MA01, LS03 y LS04 todas identificadas como *L. brevis*, donde las cepas LS03 y LS04 fueron aisladas de superficies en el área de fermentación y además poseían genes de resistencia a lúpulo, mientras que la cepa MA01 fue aislada del aire ambiente pero sin genes de resistencia. Por esto, es posible que una bacteria entre a la cervecería por el aire y cuando entra en contacto con el proceso cervecero

podría adquirir genes de resistencia a lúpulo de bacterias previamente adaptadas a estas condiciones (Bokulich *et al.*, 2015; Suzuki, 2011).

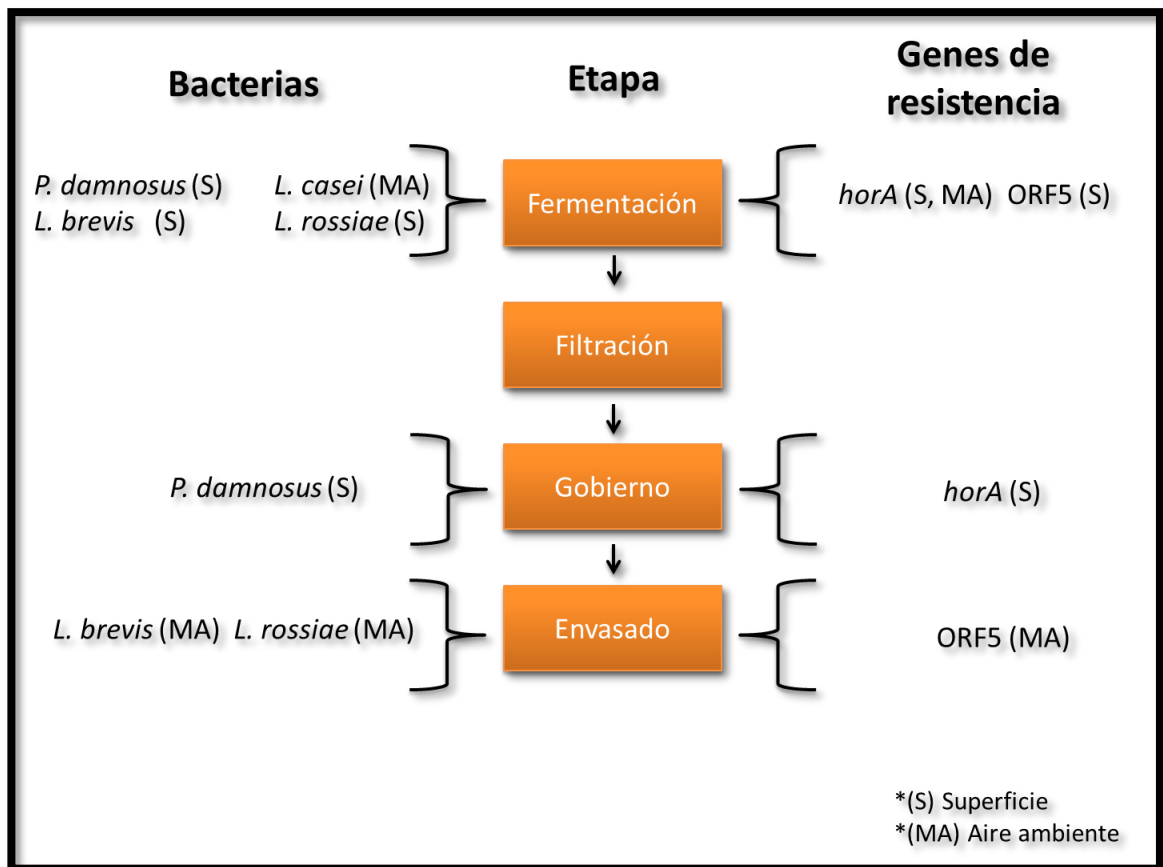


Figura 12. Visión general de las especies bacterianas y genes de resistencia correspondientes a las cepas aisladas del proceso de elaboración de cerveza.

En el presente trabajo, identificamos que el área de fermentación es donde se encuentra el mayor número de especies de BAL y genes de resistencia, esto se debe a que las condiciones en esta etapa del proceso son más aptas para el crecimiento microbiano (Bokulich y Bamforth, 2013); ya que el mosto posee un alto contenido de azúcares y oxígeno, pero conforme avanza el proceso, la levadura fermenta el mosto en cerveza eliminando los nutrientes, siendo la cerveza ahora un medio restrictivo para el crecimiento microbiano. Es posible que las bacterias potencialmente contaminantes de cerveza que entran a la cervecería por el aire o la materia prima, puedan sobrevivir en nichos del área de fermentación (Bokulich *et al.*, 2015; Bokulich y Bamforth, 2013) donde

pueden adquirir genes de resistencia a lúpulo por medio de transferencia horizontal (Suzuki, 2011) y adaptarse progresivamente al proceso cervecero (Garcia-Garcia, *et al.*, 2017), primero en las condiciones óptimas del mosto en el área de fermentación y posteriormente en las etapas más restrictivas del proceso.

## CONCLUSIÓN

Aislamos bacterias ácido lácticas del ambiente de una cervecería, principalmente especies de *Lactobacillus*. Estas cepas mostraron capacidad de crecer en cerveza y poseían los genes de resistencia a lúpulo *horA* y/o ORF5 en la mayoría de los casos. En la etapa de fermentación es donde se encontró el mayor número de especies de BAL. Aquí, las bacterias potencialmente contaminantes de cerveza pueden entrar en contacto con el mosto rico en nutrientes y con otras bacterias previamente adaptadas al ambiente cervecero y posiblemente adquirir genes de resistencia a lúpulo por transferencia horizontal, así manteniéndose en el proceso en etapas posteriores a la fermentación, contaminando y alterando la cerveza terminada.

## **PERSPECTIVAS**

La información obtenida en este estudio permitirá un mejor control de calidad microbiológico en el proceso de elaboración de cerveza rastreando las contaminaciones bacterianas y tomando las precauciones necesarias para evitar la alteración del producto final. Además, este trabajo abre camino para el estudio de un mayor número de microorganismos contaminantes y no contaminantes de cerveza habitantes del ambiente cervecero, y como se mantienen en estos nichos ecológicos permitiendo la posibilidad de intercambios genéticos horizontales con nuevos microorganismos que pudieran llegar al ambiente de elaboración de cerveza mediante la materia prima, el aire o los operadores y como pueden estar afectando el proceso de elaboración de cerveza así como la cerveza terminada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2007. Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 334–338. doi:10.1263/jbb.104.334
- Behr, J., Geissler, A.J., Preissler, P., Ehrenreich, A., Angelov, A., Vogel, R.F., 2015. Identification of ecotype-specific marker genes for categorization of beer-spoiling *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiol.* 51, 130–138. doi:10.1016/j.fm.2015.05.015
- Behr, J., Vogel, R.F., 2009. Mechanisms of hop inhibition: hop ionophores. *J. Agric. Food Chem.* 57, 6074–6081. doi:10.1021/jf900847y
- Bergsveinson, J., Baecker, N., Pittet, V., Ziola, B., 2015. Role of Plasmids in *Lactobacillus brevis* BSO 464 Hop Tolerance and Beer Spoilage. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1234–1241. doi:10.1128/AEM.02870-14
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., 2013. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 77, 157–172. doi:10.1128/MMBR.00060-12
- Bokulich, N.A., Bergsveinson, J., Ziola, B., Mills, D.A., 2015. Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance. *eLife* 4, e04634. doi:10.7554/eLife.04634
- Corsetti, A., Settanni, L., van Sinderen, D., Felis, G.E., Dellaglio, F., Gobbetti, M., 2005. *Lactobacillus rossii* sp. nov., isolated from wheat sourdough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 35–40. doi:10.1099/ijs.0.63075-0
- Deng, Y., Liu, J., Li, H., Li, L., Tu, J., Fang, H., Chen, J., Qian, F., 2014. An improved plate culture procedure for the rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* 120, 127–132. doi:10.1002/jib.121
- Fath, M.J., Kolter, R., 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995–1017.
- Fernandez, J.L., Simpson, W. J., 1993. Aspects of the resistance of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 315–319. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02782.x
- Garcia-Garcia, J., Damas-Buenrostro, L., Cabada-Amaya, J., Elias-Santos, M., Pereyra-Alferéz, B., 2017. *Pediococcus damnosus* strains isolated from a brewery environment carry the horA gene. *J. Inst. Brew.* 123:1, en prensa. doi:10.1002/jib.397
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Aquilanti, L., Clementi, F., 2015. The Occurrence of Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria in Craft Beer Production. *J. Food Sci.* 80, M2845-2852. doi:10.1111/1750-3841.13112
- Haakensen, M., Dobson, C.M., Deneer, H., Ziola, B., 2008. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the Firmicutes Phylum. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 236–241. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.002
- Haakensen, M., Ziola, B., 2008. Identification of novel horA-harboring bacteria capable of spoiling beer. *Can. J. Microbiol.* 54, 321–325. doi:10.1139/w08-007

- Iijima, K., Asano, S., Suzuki, K., Ogata, T., Kitagawa, Y., 2008. Modified Multiplex PCR Methods for Comprehensive Detection of *Pectinatus* and Beer-Spoilage Cocci. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2764–2766. doi:10.1271/bbb.80297
- Iijima, K., Suzuki, K., Asano, S., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2007. Isolation and Identification of Potential Beer-Spoilage *Pediococcus inopinatus* and Beer-Spoilage *Lactobacillus backi* Strains Carrying the horA and horC Gene Clusters. *J. Inst. Brew.* 113, 96–101. doi:10.1002/j.2050-0416.2007.tb00262.x
- Jespersen, L., Jakobsen, M., 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 139–155.
- John G. Holt, 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth edition. ed. LWW, Baltimore.
- Mallette, M.F., 1969. Chapter XV Evaluation of Growth by Physical and Chemical Means, in: Ribbons, J.R.N. and D.W. (Ed.), *Methods in Microbiology*. Academic Press, pp. 521–566.
- Priest, F.G., Cowbourne, M.A., Hough, J.S., 1974. Wort Enterobacteria—a Review. *J. Inst. Brew.* 80, 342–356. doi:10.1002/j.2050-0416.1974.tb03629.x
- Richards, M., Macrae, R.M., 1964. The Significance of the Use of Hops in Regard to the Biological Stability of Beer. li. the Development of Resistance to Hop Resins by Strains of Lactobacilli. *J. Inst. Brew.* 70, 484–488. doi:10.1002/j.2050-0416.1964.tb06353.x
- Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A., Jiménez-Díaz, R., 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal. Biochem.* 347, 333–335. doi:10.1016/j.ab.2005.09.028
- Sakamoto, K., Konings, W.N., 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 105–124.
- Sakamoto, K., Margolles, A., van Veen, H.W., Konings, W.N., 2001. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *J. Bacteriol.* 183, 5371–5375.
- Sakamoto, K., Van Veen, H.W., Saito, H., Kobayashi, H., Konings, W.N., 2002. Membrane-bound ATPase contributes to hop resistance of *Lactobacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5374–5378.
- Sami, M., Yamashita, H., Hirano, T., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., Yamasaki, M., 1997. Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *J. Ferment. Bioeng.* 84, 1–6. doi:10.1016/S0922-338X(97)82778-X
- Storgårds, E., 2000. Process hygiene control in beer production and dispensing. Technical Research Centre of Finland, Espoo.
- Suzuki, K., 2011. 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *J. Inst. Brew.* 117, 131–155. doi:10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kuriyama, H., Kitagawa, Y., 2008. Development of detection medium for hard-to-culture beer-spoilage lactic acid bacteria.

- J. Appl. Microbiol.* 104, 1458–1470. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03669.x
- Suzuki, K., Iijima, K., Ozaki, K., Yamashita, H., 2005. Isolation of a Hop-Sensitive Variant of *Lactobacillus lindneri* and Identification of Genetic Markers for Beer Spoilage Ability of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5089–5097. doi:10.1128/AEM.71.9.5089-5097.2005
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., Yamashita, H., 2006. A Review of Hop Resistance in Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *J. Inst. Brew.* 112, 173–191. doi:10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x
- Suzuki, K., Koyanagi, M., Yamashita, H., 2004. Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45. *J. Appl. Microbiol.* 96, 946–953. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02244.x
- Suzuki, K., Sami, M., Kadokura, H., Nakajima, H., Kitamoto, K., 2002. Biochemical characterization of horA-independent hop resistance mechanism in *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 223–230.
- Vaughan, A., O’Sullivan, T., Van Sinderen, D., 2005. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer — A Review. *J. Inst. Brew.* 111, 355–371. doi:10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x
- Whiting, M.S., Gares, S.L., Ingledew, W.M., Ziola, B., 1999. Brewing spoilage lactobacilli detected using monoclonal antibodies to bacterial surface antigens. *Can. J. Microbiol.* 45, 51–58. doi:10.1139/w98-220
- Wieme, A.D., Spitaels, F., Aerts, M., De Bruyne, K., Van Landschoot, A., Vandamme, P., 2014. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 41–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.003
- Ziola, 2011. Ethanol Tolerance of Lactic Acid Bacteria, Including Relevance of the Exopolysaccharide Gene gtf. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* doi:10.1094/ASBCJ-2011-0124-01
- Ziola, 2007. horA-Specific Real-Time PCR for Detection of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* doi:10.1094/ASBCJ-2007-0611-01



# RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Jorge Hugo García García

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: DISTRIBUCIÓN DE BACTERIAS CONTAMINANTES DE CERVEZA  
*Lactobacillus* Y *Pediococcus* EN EL AMBIENTE DE ELABORACIÓN DE  
CERVEZA

Campo de estudio: Microbiología industrial y Biología Molecular

Datos Personales: Nacido en Piedras Negras, Coahuila el 13 de Febrero de  
1986, hijo de Juan Antonio García García y Ana María García de García.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León con el grado de Químico Bacteriólogo  
Parasitólogo en 2009 y Maestría en ciencias con especialidad en  
Microbiología en 2012.

Experiencia Profesional: Profesor de asignatura de la unidad de aprendizaje de  
Biología Celular y Molecular en la Facultad de Ciencias Biológicas desde  
2015 y Profesor de asignatura de la unidad de aprendizaje de  
Bioinformática en la Facultad de Agronomía desde 2017.